Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Untersuchungen zum Stoffwechsel der Ribonukleinsäuren in der Rattenleber

Charakterisierung der neu-synthetisierten Fraktion

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Günther Schütz

aus Bad-Schwalbach

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

Untersuchungen zum Stoffwechsel der Ribonukleinsäuren in der Rattenleber

Charakterisierung der neu-synthetisierten Fraktion

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Günther Schütz

aus Bad-Schwalbach

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 25. 6. 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dekan: Prof. Dr. med. Siegert

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karlson

Coreferent: Prof. Dr. med. H. W. Kunz

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung

1. Welche Rolle spielen die Ribonukleinsäuren? 1
2. Wie lassen sich die Ribonukleinsäuren unterscheiden? 2
3. Wie und wo werden die Ribonukleinsäuren synthetisiert? 4
4. Warum interessiert uns die neu-synthetisierte RNS? 4
5. Wie kann man die neu-synthetisierte RNS beobachten? 6
6. Was ist über die neu-synthetisierte RNS bisher bekannt? 6

II. Material und Methoden

1. Tiere, Chemikalien, Lösungen 9
2. Extraktion der RNS 10
3. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation 12
4. Enzymatische Tests 13
5. Basenzusammensetzung 13
6. Präparation der Kernpartikel 14
7. Präparation der Ribosomen 15
8. Bestimmungen 15

Seite

III. Ergebnisse

1. Die schnell markierte RNS ist hochmolekular 16
2. Die schnell markierte RNS ist kein Aggregat 20
3. Die schnell markierte RNS bleibt auf den Zellkern beschränkt 23
4. Die schnell markierte RNS ist instabil 26
5. Die schnell markierte RNS hat eine DNS-ähnliche Basenzusammensetzung 30
6. Ein Teil der schnell markierten RNS ist an Ribonukleoproteinpartikel gebunden 32
7. Die Kernpartikel sind nicht mit Polysomen identisch 34
8. Die Kernpartikel bestehen aus 30 S-Untereinheiten 35
9. Die RNS der Kernpartikel ist relativ klein 36
10. Die Kernpartikel sind in der Lage, hochmolekulare RNS abzubauen 39

IV. Diskussion 41

V. Zusammenfassung 48

VI. Literatur 50

I. Einleitung:

Welche Rolle spielen die Ribonukleinsäuren?

Die Ribonukleinsäuren spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinbiosynthese. Die Struktur der Proteine ist genetisch kontrolliert; ihre Synthese erfolgt aber nicht unmittelbar an der DNS, dem Träger der Erbmerkmale, sondern an den Ribosomen. Die Information der DNS wird in eine bestimmte RNS, die sogenannte "messenger-RNS" (m-RNS), umgeschrieben, die sich mit den Ribosomen verbindet und als Matrize wirkt. Die Ribosomen sind 150 Å große Partikel, die die "ribosomale RNS" (r-RNS) enthalten. Bei der "Übersetzung" der Information aus der Nukleinsäuresprache (= Basensequenz) in die Proteinsprache (= Aminosäuresequenz) wirkt die "transfer-RNS" (t-RNS) mit.

Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird bestimmt durch die Nukleotidordnung eines umschriebenen Abschnitts der DNS, des entsprechenden Gens, und zwar in der Weise, daß jeweils drei Nukleotide eine Aminosäure festlegen.

Im einzelnen übernehmen die verschiedenen Ribonukleinsäuren - m-RNS, r-RNS und t-RNS - bei der Proteinsynthese folgende Aufgaben: Zunächst wird die Aminosäure mittels ATP durch ein für sie spezifisches Enzym aktiviert. Anschließend wird die aktivierte Aminosäure durch dasselbe Enzym auf eine für diese Aminosäure spezifische t-RNS übertragen (Aminosäureaktivierung im Schema der Abb. 1). Diese Aminoacyl-t-RNS wird an die Ribo-

somen herangeführt und entsprechend der Basensequenz der m-RNS aufgereiht, die mit den Ribosomen eine zusammenwirkende Einheit, die Polysomen, bildet. Unter Abspaltung des Aminoacyl-Restes wird die Aminosäure in die Peptidkette eingebaut (Proteinsynthese im Schema der Abb. 1) (Translation). Die m-RNS dient also bei der Proteinsynthese als Matrize und sorgt für die korrekte Umschreibung eines Gens in die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins.

Wie lassen sich die verschiedenen Ribonukleinsäuren unterscheiden?

Die drei Klassen der Ribonukleinsäuren sind nicht nur durch ihre Funktion, sondern auch durch ihre Molekülgröße, Basenzusammensetzung und Hybridisierbarkeit zu unterscheiden. (Fähigkeit von RNS-Molekülen nach Erhitzen und langsamem Abkühlen mit homologer DNS Doppelstränge zu bilden. Hoher Hybridisationsgrad bedeutet, daß große Teile der DNS zur RNS komplementär sind.) Die ribosomale RNS sedimentiert mit zwei distinkten Gipfeln, mit den Sedimentationswerten 28 S und 18 S, entsprechend einem Molekulargewicht von $1{,}2 \times 10^6$ bzw. $0{,}6 \times 10^6$. Im Gegensatz hierzu zeigt die m-RNS ein heterogenes Sedimentationsverhalten zwischen r-RNS und t-RNS. Die t-RNS ist niedermolekular und sedimentiert im 4 S-Bereich. Die m-RNS spiegelt die Basenzusammensetzung der homologen DNS wider, die ribosomale RNS jedoch ist bei allen Spezies durch einen hohen G + C-Gehalt ausgezeichnet (12, 19).

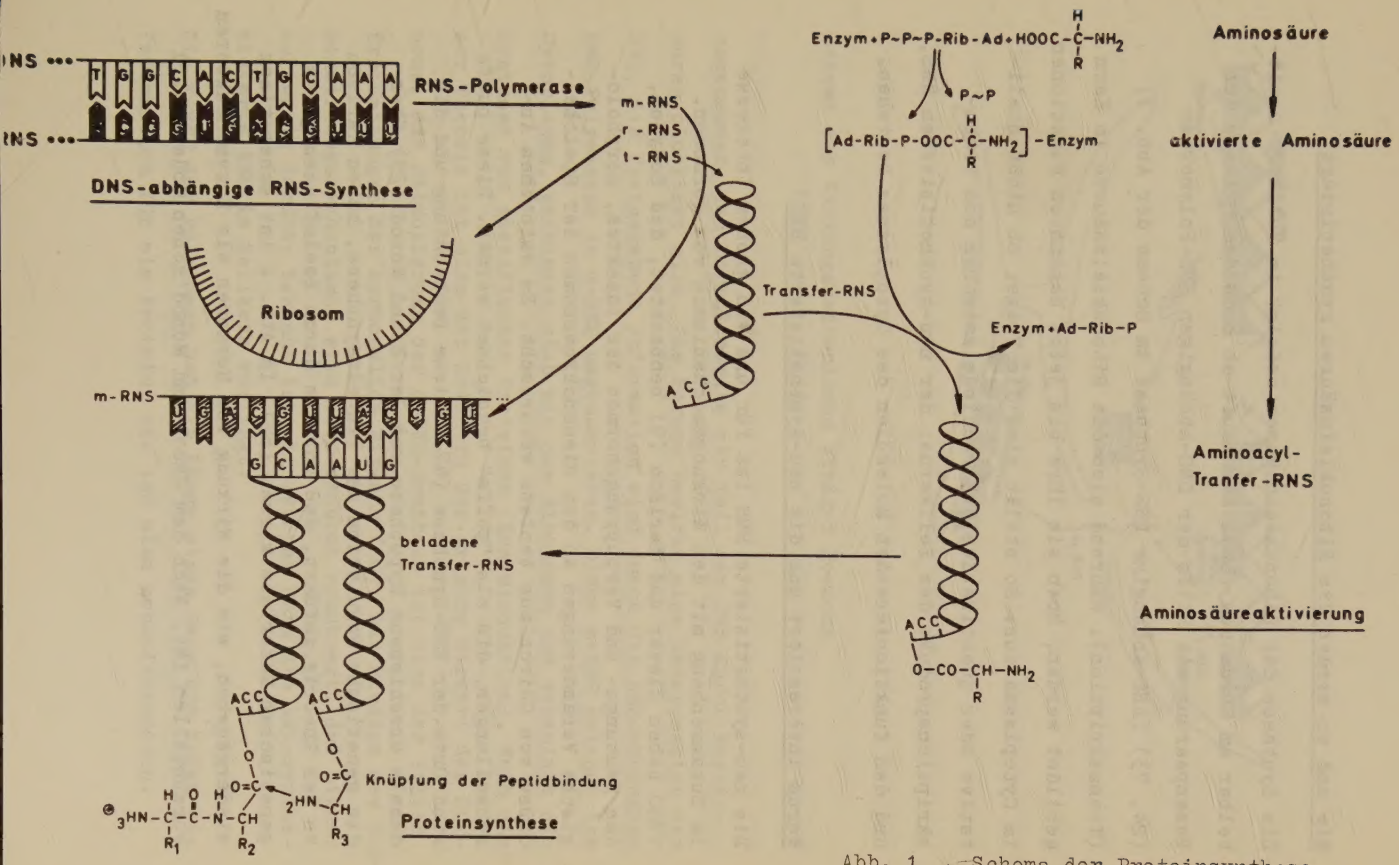


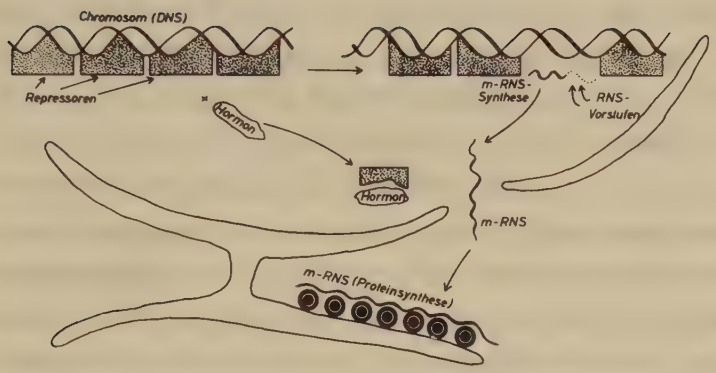
Abb. 1 Schema der Proteinsynthese

Wie und wo werden die Ribonukleinsäuren synthetisiert?

Die Synthese der Ribonukleinsäuren erfolgt im Zellkern unmittelbar am Chromosom (50). Sie läuft ab nach dem Prinzip der Basenpaarung mit Hilfe der DNS-abhängigen RNS-Polymerase (24, 73) (DNS-abhängige RNS-Synthese im Schema der Abb. 1) (Transskription). Während also die Ribonukleinsäuren im Kern gebildet werden, üben sie ihre bis jetzt bekannten Funktionen im Cytoplasma aus. So stellt sich die Frage, ob nicht qualitative oder quantitative Unterschiede zwischen dem Transskriptionsprodukt des Zellkerns, der neu-synthetisierten RNS, und den funktionierenden Molekülen des Cytoplasmas bestehen.

Warum interessiert uns die neu-synthetisierte RNS?

Die neu-synthetisierte RNS ist für uns von großem Interesse im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus von Hormonen. 1960 haben Clever und Karlson (9) beobachtet, daß Ecdyson, das Häutungs- und Verpuppungshormon der Insekten, morphologische Veränderungen an den Riesenchromosomen der Speicheldrüse von Chironimus tentans verursacht. Es entstehen Anschwellungen, die als "puffs" bezeichnet werden. Diese puffs sind Orte der RNS-Synthese (47). Diese Beobachtung und die damals erschienene Hypothese von Jacob und Monod (29) über die genetische Regulation der Proteinsynthese, haben Karlson zu der Theorie geführt, daß Hormone durch Beeinflussung des genetischen Materials wirken (30). In Abb. 2 ist schematisch wiedergegeben, wie die Wirkung von Hormonen als Enzyminduktoren vorzustellen ist. Nach dem Jacob und Monod'schen Modell wird



Schema des Wirkungsmechanismus einiger Hormone

angenommen, daß normalerweise ein Teil der DNS durch Repressoren blockiert wird. Das Hormon bewirkt eine Derepression der DNS, die freigegebene Information wird durch die DNS-abhängige RNS-Polymerase in m-RNS umgeschrieben. Diese m-RNS gelangt ins Cytoplasma, verbindet sich mit den Ribosomen und veranlaßt die Synthese von spezifischen Proteinen (Enzyminduktion). Nach dieser Theorie ist also der Zellkern der primäre Wirkort des Hormons, die Stimulierung der m-RNS-Synthese ist eine der ersten Erscheinungen der hormonellen Wirkung (60). Das Studium des Hormonwirkungsmechanismus wird aber dadurch erschwert, daß bisher nur wenig darüber bekannt ist, in welcher Form die neu-synthetisierte RNS im Zellkern vorliegt.

Die m-RNS der Polysomen hat die Länge eines Gens und trägt die Information für ein Protein, sie ist also monocistronisch.

Zum Beispiel besteht die m-RNS in E. coli aus 900 bis 1500 Nukleotiden, entsprechend einem Protein von 300 bis 500 Aminosäuren. In der letzten Zeit wurden m-RNS-Moleküle aus Bakterien isoliert, die die Information für mehrere Enzyme in sich tragen; es handelt sich also um polycistronische m-RNS (27, 38). Wenig ist darüber bekannt, wie die neu-synthetisierte RNS in der Rattenleber vorliegt und wie die Informationsübertragung vom Genom zum Cytoplasma verläuft. Ist die neu-synthetisierte RNS eine Abschrift eines oder mehrerer Genabschnitte? Übernimmt die ganze neu-synthetisierte RNS Aufgaben bei der Proteinbiosynthese?

Wie kann man die neu-synthetisierte RNS beobachten?

Mit Hilfe der radioaktiven Markierung kann man die neu-synthetisierte RNS erfassen und mit der funktionierenden RNS des Cytoplasmas vergleichen. Aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer wird sie bevorzugt markiert sein.

Was ist über die neu-synthetisierte RNS bisher bekannt?

Die schnell markierte RNS besitzt nun ganz andere Sedimentationseigenschaften als die gesamte Zell-RNS, ihr Radioaktivitätsprofil stimmt nicht mit dem UV-Profil der Zell-RNS überein. Sowohl aus sich teilenden als auch sich nicht teilenden Zellen ist schnell markierte RNS in Form von Molekularspezies mit Sedimentationswerten größer als 28 S isoliert worden (6, 14, 16, 22, 40, 43, 44, 46, 48, 52, 56, 57, 59, 65, 74, 75). Zahlreiche Ergebnisse sprechen dafür, daß der Teil der schnell

markierten RNS, der im 45 S-Bereich sedimentiert, der direkte Vorläufer der ribosomalen RNS ist (43, 48, 57). Blockiert man zum Beispiel die RNS-Synthese durch Aktinomycin D, so verschwindet der 45 S-Gipfel, die Radioaktivität erscheint im 28 S- und 18 S-Gipfel der ribosomalen RNS. Die 45 S-RNS gleicht in ihrer Basenzusammensetzung der ribosomalen RNS.

Neben dieser Vorstufe der r-RNS wurden in der schnell markierten RNS Komponenten mit DNS-ähnlicher Basenzusammensetzung gefunden (6, 16, 57, 74, 75), unter anderem auch in Rattenleberkernen (4, 5, 13, 17, 18, 22, 31, 44, 67). Diese RNS besitzt einige Eigenschaften, die typisch für die m-RNS sind: sie ist metabolisch instabil (57, 74, 75), zeigt hohen Hybridisationsgrad (57, 75) und besitzt stimulierende Wirkung in einem Aminosäureeinbauenden in vitro-System (4, 5, 13, 18, 57).

In den letzten Monaten wurden RNS-Spezies mit sehr großem Molekulargewicht aus Entenerythrozyten (1, 58) und HeLa-Zellen (23, 70, 62) extrahiert, die durch einige Eigenschaften an eine Verwandtschaft mit m-RNS denken lassen. Jedoch fehlt ein überzeugender Beweis, daß diese Kern-RNS mit der cytoplasmatischen m-RNS in Beziehung steht.

In den Arbeiten (6, 14, 16, 22, 40, 43, 44, 46, 48, 52, 56, 57, 59, 65, 74, 75) wurden ganz unterschiedliche Sedimentationswerte für die schnell markierte RNS angegeben. Die Ursache hierfür mag in unterschiedlichen Extraktionsbedingungen liegen, die mehr oder weniger starke Degradation erlauben.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die frühe RNS-Synthese und einige Eigenschaften der schnell markierten RNS der Rattenleber untersucht. Dabei wurde großer Wert darauf gelegt, RNS-abbauende Prozesse zu unterbinden, um die neu-synthetisierte RNS in ihrer ursprünglichen Größe zu bewahren. Mit der RNS-Extraktion direkt aus dem Homogenat in Gegenwart mehrerer RNase-Inhibitoren gelang es, die neu-synthetisierte RNS in Form sehr großer Moleküle zu erhalten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde nach RNS - in freier oder strukturgebundener Form - im löslichen Raum des Zellkerns gesucht, also gleichsam "auf dem Wege" vom nukleochromosomalen Apparat, dem Ort der Synthese, zum Wirkort, dem Cytoplasma. Die Kenntnis dieser RNS ist eine notwendige Voraussetzung, um die Informationsübertragung vom Zellkern zum Cytoplasma in Einzelschritten analysieren zu können. Die Phenolextraktion ist zur Isolierung gebundener RNS nicht geeignet, da Proteinstrukturen durch sie zerstört werden. Wir haben deshalb gereinigte Zellkerne lysiert, das Chromatin abzentrifugiert und den Kernüberstand im Dichtegradienten analysiert. Er enthält Ribonukleoproteinpartikel, an die schnell markierte RNS gebunden ist. Einige Befunde über den Aufbau und eine mögliche Funktion dieser Partikel werden beschrieben.

II. Material und Methoden:

1. Tiere, Chemikalien, Lösungen:

Die Ratten vom Stamm Wistar B II (ca. 150g) wurden von der Tierzüchterei Brünger bezogen.

6-^{14}C-Orotsäure (44,5 mC/mM), 5-^{3}H-Orotsäure (700 mC/mM) und Träger-freies $^{32}PO_4$ (in verdünnter HCl-Lösung, die vor Gebrauch neutralisiert wurde) wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, bezogen.

Orotsäure, Polyvinylsulfat als Kaliumsalz und Dodecylsulfat als Natriumsalz stammten von Serva, Heidelberg, gleichfalls Bentonit, das nach der Methode von Fraencel-Conrat vorbehandelt wurde (15).

Pankreas-Ribonuklease (dreifach kristallisiert) und RNase-freie DNase waren Produkte der Worthington Biochemical Corporation.

Pronase, grade B, wurde von der California Corporation for Biochemical Research bezogen.

Aktinomycin D war ein Geschenk von Professor Harbers, Göttingen, Triton X-100 eine Gabe der Firma Rohm & Haas, Philadelphia.

Lösungen:

a) 0.05 M Natriumazetat pH 5, 0,14 M NaCl, 0,5 % Natriumdodecylsulfat, 4 mg/ml Bentonit, 150 µg/ml Polyvinylsulfat.

b) 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl, 0,01 M $MgCl_2$.

c) 0,01 M Natriumazetat pH 5, 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA.

d) 0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 0,01 M KCl.

e) 0,05 M Tris-HCl pH 7,5, 0,008 M $MgCl_2$, 0,007 M KH_2PO_4.

2. Extraktion der RNS

Die markierte Orotsäure wurde entweder intraperitoneal oder direkt in die Pfortader injiziert, und die Ratten durch Genickschlag nach verschiedenen Markierungszeiten getötet. Die Leber wurde mit eiskaltem Extraktionspuffer durchspült, mit einer Schere zerkleinert und in einem Glas-Teflon-Homogenisator nach Potter-Elvehjm in 60 ml Extraktionspuffer (Lösung a) homogenisiert. Zu diesem Homogenat wurde ein gleiches Volumen redestilliertes, wassergesättigtes Phenol hinzugegeben und die RNS durch heftiges Schütteln bei 65°C 5 Minuten lang extrahiert. Die wässrige Phase, die die RNS enthält, wurde durch 5-min.-Zentrifugation bei 10.000 g in einer Sorvall-Zentrifuge von der Phenolphase getrennt, abgehoben und noch zweimal mit Phenol extrahiert. Die wässrige Phase wurde schließlich mit Äther mehrmals geschüttelt, um gelöstes Phenol zu entfernen, und daraus die RNS durch Zugabe von 2 Volumen Äthernol und 1 mg NaCl/ml wässrige Phase bei -20°C gefällt.

Die RNS wurde durch eine 10-min.-Zentrifugation bei 8.000 g gesammelt und von restlichem Alkohol und Äther in einem Exsikkator befreit. Die RNS wurde dann in Wasser gelöst und im Dichtegradienten analysiert.

Für die Extraktion der RNS aus Kernen oder aus dem Cytoplasma wählten wir die folgenden Präparationsmethoden:

a) Modifikation der Methode nach Cheauveaux (7):
Die Leber wurde in Lösung b homogenisiert, durch 6 Schichten Mull filtriert, um bindegewebige Anteile zu entfernen, und das Homogenat 5 Minuten lang bei 800 g in einer Sorvall zentrifugiert. Das grobe Kernsediment wurde in 2,2 M Saccharose, 0,003 M Calciumazetat-Lösung resuspendiert und eine Stunde bei 40.000 g in einer Sorvall zentrifugiert. Die gereinigten Kerne wurden im Extraktionspuffer suspendiert und die RNS wie oben beschrieben extrahiert.

b) Kernpräparation mit Triton X-100:
Zu dem wie unter a) bereiteten Homogenat wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,5% hinzugegeben und 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Das Kernsediment wurde nochmals in Lösung b gewaschen und daraus die RNS extrahiert.
Mit dem Phasenkontrastmikroskop beurteilten wir die Reinheit der Kerne; sie war bei beiden Methoden gut.

c) Die cytoplasmatische Fraktion wurde durch 20-min.-Zentrifugation des Kernüberstandes bei 20.000 g in einer Sorvall gewonnen; die RNS, aus diesem postmitochondrialen Überstand extrahiert, stellte die cytoplasmatische RNS dar.

3. Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Vor der Herstellung der Gradienten wurden die Saccharoselösungen mit Bentonit in einer Konzentration von 100 µg/ml vorbehandelt und 40 Minuten bei 40.000 g in einer Sorvall zentrifugiert, um Spuren von RNase zu entfernen. Die RNS-Probe wurde sorgfältig auf 28 ml eines linearen Saccharosegradienten (5-40 %) in Lösung c aufgetragen und bei verschiedenen g-Werten und verschieden lang zentrifugiert (vgl. Legenden zu den Abbildungen). 0,7-1 ml-Fraktionen wurden durch Anstechen des Röhrchens mit einer Kanüle gesammelt und ihre UV-Absorption bei 260 mµ in einem Zeiss-PMQ II-Spektral-Photometer gemessen. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde mit eiskalter 5 %iger Trichloressigsäure auf Filterpapier (Schleicher & Schüll 2043 b) präzipitiert, nach 30 Minuten mehrmals mit 5 %iger Trichloressigsäure, anschließend mit Äther:Äthanol 1:1 und Äther gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität der Blättchen in der Zählflüssigkeit (5 g PPO, 0,1 g POPOP in 1 l Toluol gelöst) in einem Packard oder Nuclear Chicago-Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Dichtegradientenanalyse der Kernpartikel wurde entsprechend ausgeführt.
Die Sedimentationskonstanten wurden nach Wettstein (63) bestimmt. In einem linearen Saccharosegradienten gilt, daß die Wanderungsstrecke v eines Moleküls der Zentrifugationszeit t und seiner Sedimentationskonstante S proportional ist (v=k.S.t.). Bezieht man sich auf die 28 S r-RNS, kann man aus der relativen Wanderung verschiedener Fraktionen im Vergleich mit der 28 S r-RNS ihre Sedimentationskonstante be-

rechnen. Es ist demnach:

$$\frac{x\ S}{28\ S} = \frac{v_{x\ s}}{v_{28\ S}}$$

4. Enzymatische Tests

Um den Effekt verschiedener Enzyme auf das Sedimentationsverhalten der RNS zu untersuchen, wurden folgende Vorbehandlungen durchgeführt:

a) RNase-Behandlung:
Die RNS, gelöst in Wasser, wurde mit 10 µg/ml DNase-freier RNase bei 4°C 10 Minuten lang inkubiert und anschließend im Dichtegradienten analysiert.

b) DNase-Behandlung:
Die RNS wurde in 0,05 M Natriumazetat pH 5, 0,005 M $MgCl_2$ gelöst, mit 40 µg/ml RNase-freier DNase 20 Minuten bei 37°C behandelt und anschließend im Dichtegradienten zentrifugiert.

c) Pronase-Behandlung:
Die RNS, gelöst in 0,01 M Tris-HCl pH 7,4, wurde mit 10 µg/ml Pronase 10 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert.
Unter den gleichen Bedingungen wurden 75 % einer 10 mg/ml enthaltenden Albuminlösung säurelöslich gemacht.

5. Basenzusammensetzung

30 Minuten nach Injektion von 2 mC ^{32}P i.p. wurden die Tiere getötet und die RNS aus dem Homogenat extrahiert. Durch Chromatographie auf einer Dowex-Säule 1-X10 in Formiatform wurde sie von nicht eingebautem Phosphat gereinigt (49). Die Sedi-

mentationseigenschaften wurden durch diese Chromatographie nicht verändert. Nach der Auftrennung im Dichtegradienten wurde die RNS aus verschiedenen Teilen des Gradienten nach Zugabe kalter ribosomaler RNS mit 0,3 N KOH bei 37°C 18 Stunden hydrolysiert. Die 2',-3'-Nukleotide wurden durch Papierchromatographie nach Lane (34) getrennt. Whatman No 1 Chromatographiepapier wurde mit 20 %igem Ammoniumsulfat gewaschen, die Nukleotide durch absteigende Chromatographie mit Äthanol:Wasser 4:1 nach 20 Stunden aufgetrennt. Die Position der einzelnen Nukleotide wurde mit einer UV-Lampe identifiziert, die Flecken ausgeschnitten und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. In einigen Experimenten wurde die Nukleotidtrennung mit der Hochspannungselektrophorese in 0,02 M Natriumazetatpuffer pH 3,8 (3 Stunden bei 50 V/cm) ausgeführt (10).

6. Präparation der Kernpartikel

Kerne wurden, wie unter 2a) beschrieben, präpariert und anschließend durch Ultraschallbehandlung in 1 ml/Leber in Lösung b oder im postmikrosomalen Überstand (erhalten durch 4-stündige Zentrifugation des postmitochondrialen Überstandes (s. II 2) bei 50.000 Umdrehungen/Minute) lysiert. Das Kernlysat wurde 15 Minuten bei 12.000 Umdrehungen zentrifugiert, das Sediment enthält das Chromatin, der Überstand dient zur Analyse im Dichtegradienten (Kernüberstand), er enthält die Kernpartikel. Die RNS der Kernpartikel wurde wie unter 2b) beschrieben extrahiert.

7. Präparation der Ribosomen

Der postmitochondriale Überstand, der wie unter 2c) gewonnen wurde, wurde mit 2,5 % Desoxycholat in 0,1 M Glycyl-glycin-Puffer versetzt bis zu einer Endkonzentration von 0,25 % und anschließend bei 105.000 g 90 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde nochmals in Lösung b aufgenommen und ein zweites Mal bei 105.000 g 90 Minuten zentrifugiert.

8. Bestimmungen

Protein: Mit alkalischem Kupfersulfat und Folins-Reagenz nach Lowry (37).

RNS: Die RNS der Kernpartikel und Ribosomen wurde mit 5 %iger Perchlorsäure extrahiert und die RNS nach der Orcinmethode bestimmt (45).

DNS: Nach der Methode von Ceriotti (8).

III. Ergebnisse:

1. Die schnell markierte RNS ist hochmolekular.

Zum Studium der RNS-Synthese eignet sich Orotsäure als radioaktiver Vorläufer. Die Reaktionen, die zum UTP bzw. CTP hinführen, laufen so schnell ab, daß wir selbst bei Markierungszeiten von 1 Minute nach intraportaler Injektion eine ausgezeichnete Markierung der RNS erhielten. Diese extrem kurze Markierungszeit hat einmal den Vorteil, daß wir die neu synthetisierte RNS in statu nascendi beobachten können, zum andern liefert die r-RNS-Synthese zu diesem Zeitpunkt einen nur relativ geringen Beitrag zur schnell markierten RNS (70).

In einer Zeitkinetik versuchten wir, Einblick in das Schicksal der neu synthetisierten RNS zu gewinnen. Um hierbei die Sedimentationsdiagramme wirklich miteinander vergleichen zu können, wählten wir die Doppelmarkierung. Bei dieser Methode wurde einem Versuchstier ^{14}C- und ^{3}H-Orotsäure injiziert. Zu der Zeit, die in jedem Experiment angegeben ist (vgl. die Legenden zu den Abbildungen), wurde dem Tier zunächst ^{3}H-Orotsäure gegeben. 4 Minuten vor der Tötung wurde jeweils ^{14}C- Orotsäure injiziert. Im isolierten RNS-Präparat wurden dann ^{3}H-Aktivität und ^{14}C-Aktivität getrennt gemessen. Die ^{14}C-Aktivität stellt dabei einen Standard dar, mit dem die ^{3}H-Aktivität verglichen werden kann. Durch die Identität der jeweils als Vergleich dienenden Kurve der 4-Minuten-RNS konnten wir uns von der Güte der RNS-Präparation überzeugen.

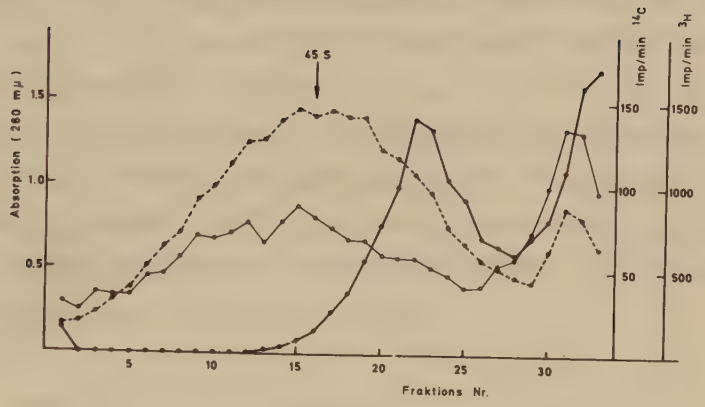


Abb. 3

Sedimentationsprofil der schnell markierten RNS

Die RNS, aus dem Homogenat extrahiert, wurde im Dichtegradienten (5-40 % g/v) 12 Stunden bei 21.000 Umdrehungen/min in einem SW-25-Rotor zentrifugiert. Den Ratten war 30 Minuten vor Tötung ^{3}H-Orotsäure (100 µC/100g) und 4 Minuten vor Tötung ^{14}C-Orotsäure (30 µC/100g) intraperitoneal injiziert worden. Der C-Wert dient in diesem und in den folgenden Versuchen als Vergleichswert.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - - ● ^{3}H-Radioaktivität

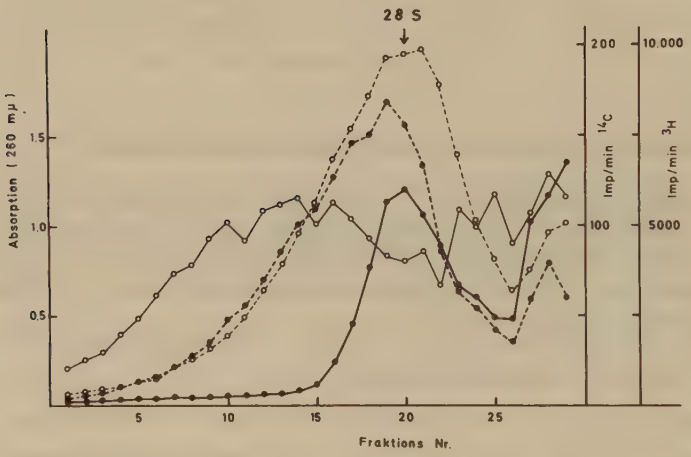
Abb. 3 zeigt die Analyse der neu synthetisierten RNS im Dichtegradienten nach Doppelmarkierung. Die Radioaktivität ist nach 4-Min.-Markierung über den ganzen Gradienten verteilt mit Sedimentationskoeffizienten von 10 S bis 80 S; der größte Teil sedimentiert vor dem 28 S-Gipfel der r-RNS.

Zwei Punkte sollen besonders herausgestellt werden:

a) Es sind keine distinkten Gipfel zu sehen. Dies legt nahe, daß die neu synthetisierte RNS eine heterogene Gruppe von Molekülen mit stark wechselnder Größe darstellt.

b) Nach 4 Min.-Markierung sedimentiert etwa 35 % des radioaktiven Materials schneller als 45 S.

Nach 30 Min.-Markierung verteilt sich die Radioaktivität sehr ähnlich im Dichtegradienten. Zusätzlich ist aber eine beträchtliche Ansammlung des radioaktiven Materials im 30 S - 50 S-Bereich zu beobachten. Dieser Anstau ist vermutlich auf die Synthese der ribosomalen RNS zurückzuführen.



Nr. 4

Sedimentationsprofil der RNS nach längerer Markierung

Die RNS, für 4 Minuten mit ^{14}C- (30 µC/100 g) und für 6 bzw. 12 Stunden mit ^{3}H-Orotsäure (100 µC/100 g) markiert, wurde im Dichtegradienten 13 Stunden bei 21.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die 6- und 12-Stunden-Kurven stammen aus getrennten Experimenten.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität nach 6 Stunden

o- - -o ^{3}H-Radioaktivität nach 12 Stunden

Mit längerer Markierungszeit nimmt die Radioaktivität im schweren Bereich des Gradienten mehr und mehr ab und verschiebt sich zu kleineren Sedimentationskoeffizienten (Abb. 4).

Zum Vergleich ist die RNS des Cytoplasmas nach 6 Stunden im 28 S- bzw. 18 S-Gipfel markiert (Abb. 5). Die RNS >28 S ist demnach Kern-RNS. Entscheidend ist, daß sich ihr Anteil an der Gesamt-RNS nach längerer Markierungszeit (6 und 12 Stunden) beträchtlich vermindert hat.

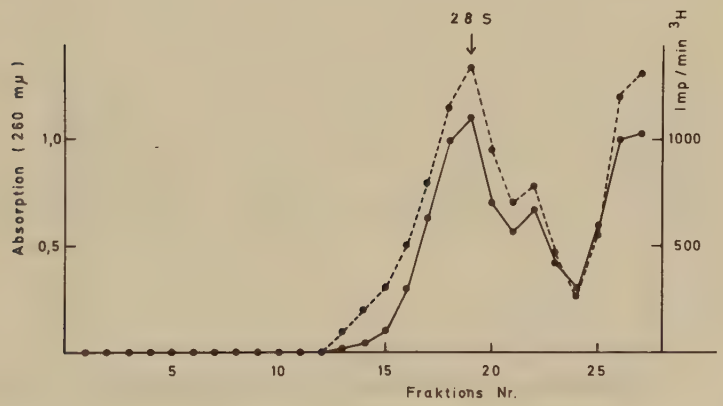


Abb. 5.

Sedimantationsprofil der cytoplasmatischen RNS

Die cytoplasmatische RNS stammt aus dem gleichen Versuch (6 Stunden Markierung), der in Abb. 2 beschrieben ist. Zentrifugationsbedingungen wie in Abb. 2.

●——● U.V. Absorption, ●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

Die schnell markierte RNS ist kein Aggregat.

Der Nachweis in der schnell markierten RNS von Komponenten mit größeren Sedimentationskonstanten, als bisher für Leber-RNS angegeben, warf die Frage auf, ob diese Sedimentationswerte tatsächlich Moleküle entsprechender Größe darstellen, oder ob sie nicht vielmehr durch Aggregation aus kleineren Molekülen entstanden sind.

Das radioaktive Material wird vollständig durch RNase-Behandlung abgebaut; es stellt also sicher RNS dar, die auch nicht hybridartig mit DNS verbunden ist.

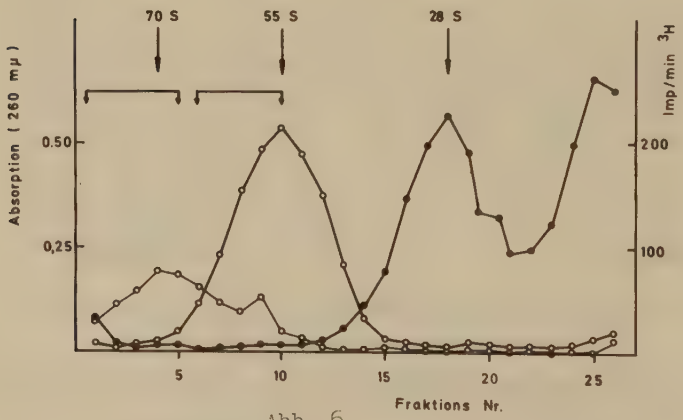


Abb. 6

Rezentrifugation der schnell markierten RNS

Nach Dichtegradientenzentrifugation der schnell markierten RNS, wie in Abb. 1 beschrieben, wurden die Fraktionen 1-5 und 6-10 zusammen mit mikrosomaler RNS durch Äthanol ausgefällt. Die RNS wurde dann 12 Stunden bei 21.000 Umdrehungen rezentrifugiert.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

Auch in Rezentrifugationsexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei der schnell sedimentierten RNS tatsächlich um distinkte Molekülspezies handelt, das Ergebnis also nicht durch Schmieren des Gradienten vorgetäuscht wird.

Hierzu wurde das markierte Material > 50 S mit Äthanol präzipitiert und nochmals im Dichtegradienten analysiert. Abb. 6 zeigt, daß das schwere Material wieder dieselbe Position einnimmt. Auf diese Weise konnten Moleküle mit Sedimentationswerten bis zu 80 S nachgewiesen werden.

Um die Möglichkeit einer Aggregatbildung auszuschließen, untersuchten wir den Einfluß verschiedener Vorbehandlungen der schnell markierten RNS auf ihr Sedimentationsverhalten.

Nach Behandlung mit Pronase (10 µg/ml, 10 Std., 25°C) zeigte die schnell markierte RNS dieselben Sedimentationseigenschaften. Gegen Protein als Ursache einer Aggregatbildung spricht außerdem die dreimalige Deproteinisierung mit Phenol im Verlauf der Aufarbeitung.

Abb. 7 läßt erkennen, daß auch nach DNase-Behandlung (40 µg/ml 20 min., 37°C) das Sedimentationsbild der markierten RNS unverändert bleibt.

Von mehreren Autoren (39, 41) wurde Komplexbildung zwischen m-RNS und r-RNS in Abhängigkeit von divalenten Kationen, insbesondere Mg^{++}, beschrieben, die durch Zugabe von EDTA verhindert wird. Wir testeten daher die Wirkung von EDTA; aber Einschluß von EDTA sowohl in den Dichtegradienten als auch in das Extraktionsmedium hatten keinen Einfluß auf das Sedi-

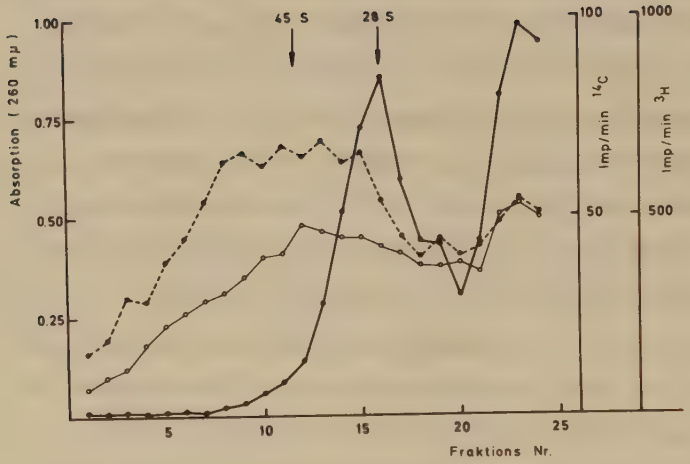


Abb. 7

Sedimentationsprofil der schnell markierten RNS nach DNase-Behandlung

Doppelt markierte RNS, wie im Experiment der Abb. 1 beschrieben, wurde mit DNase (40 µg/ml) 20 min. bei 37°C inkubiert und anschließend 14 Stunden bei 21.000 Umdrehungen im Dichtegradienten zentrifugiert.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

mentationsverhalten der schnell markierten RNS. Aggregatbildung durch DNS, Protein und Mg^{++} ist somit wegen der Stabilität der schweren RNS nach den beschriebenen Vorbehandlungen unwahrscheinlich.

3. Die schnell markierte RNS bleibt auf den Zellkern beschränkt.

Die Extraktion aus dem Homogenat gibt keinen Einblick in den Ursprung oder die Verteilung der neu synthetisierten RNS in der Zelle. Wir fraktionierten deshalb das Homogenat und extrahierten die RNS aus reinen Zellkernen und dem postmitochondrialen Überstand. Die Gesamtradioaktivität der beiden Fraktionen wurde verglichen und ihre RNS im Dichtegradienten analysiert.
Tabelle 1 läßt erkennen, daß fast die gesamte RNS auf den Zellkern beschränkt bleibt.

Tabelle 1: Verteilung der radioaktiven RNS in der Zelle

Markierungszeit	% an markierter RNS in der	
	Kern-	cytoplasmatischen Fraktion
4 Minuten	98 %	2 %
15 Minuten	97 %	3 %
30 Minuten	96 %	4 %
2,5 Stunden	84 %	16 %

Die RNS, die aus reinen Kernen gewonnen wurde, zeigt ein ähnlich heterogenes Sedimentationsdiagramm wie die Homogenat-RNS (Abb. 8).
Ein Vergleich mit Abb. 3 zeigt aber deutlich, daß der Anteil an schnell sedimentierender RNS in reinen Kernen erheblich geringer ist[1].

1 In der U.V.-Kurve ist im 45 S-Bereich eine Schulter zu sehen. In diesem Experiment wurde die Kern-RNS einer ganzen Leber aufgetragen, während bei den zuvor beschriebenen Experimenten jeweils nur etwa ein Viertel davon analysiert wurde.

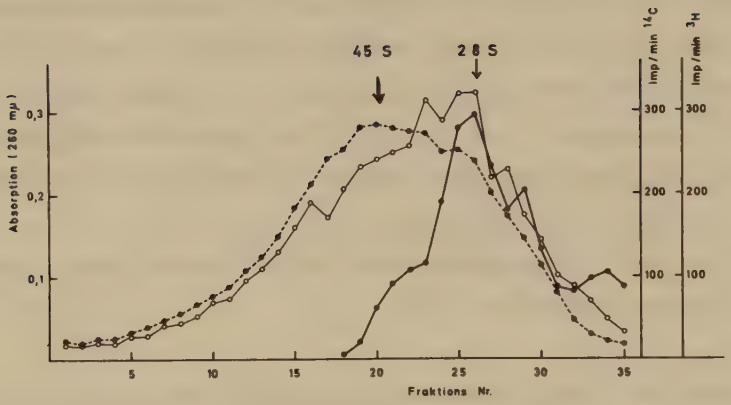


Abb. 8

Sedimentationsprofil der RNS aus "Cheauveaux-Kernen"

Nach Doppelmarkierung (^{14}C-Orotsäure, 4 min, 20 µC/100 g) und ^{3}H-Orotsäure, 30 min, 50 µC/100 g) wurde die RNS aus Kernen nach der Methode von Cheauveaux präpariert, extrahiert und im Dichtegradienten 13 Stunden bei 20.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

Die in 30 Minuten markierte RNS des Cytoplasmas ist in den beiden ribosomalen Gipfeln konzentriert (Abb. 9). Es fällt auf, daß die 18 S-RNS eine etwa zweifach höhere spezifische Aktivität besitzt als die 28 S-RNS.

Die heterogene Verteilung der schnell markierten RNS des Cytoplasmas, die von verschiedenen Autoren (13, 35, 42, 63) als Charakteristikum für m-RNS beschrieben wurde, konnten wir nicht beobachten. Unsere Ergebnisse unterstützen

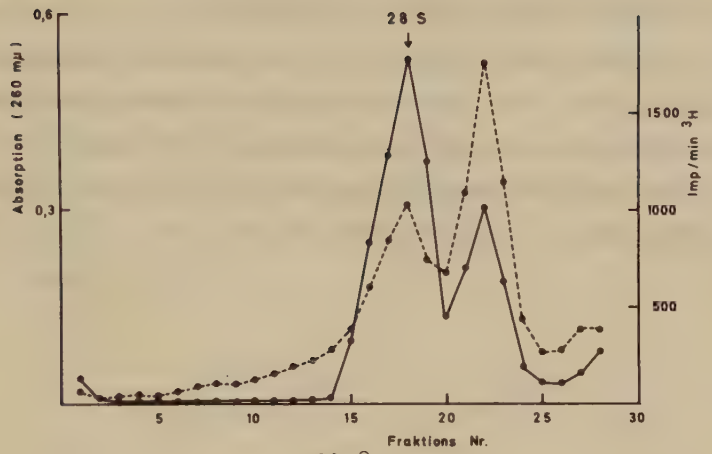


Abb.9

Sedimentationsprofil der cytoplasmatischen RNS

30 Minuten nach Injektion von 100 µC/100 g ^{3}H-Orotsäure wurde die RNS aus dem Cytoplasma isoliert und im Dichtegradienten 13 Stunden bei 20.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.
●———● U.V. Absorption, ●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

die Befunde neuerer Untersuchungen, wonach die Polydispersität Folge teilweiser Degradation ist (21, 68).

Im Cytoplasma wurde keine RNS gefunden, die schneller als 28 S sedimentiert. Dies und die Tatsache, daß nur ein verschwindend kleiner Teil der schnell markierten RNS ins Cytoplasma wandert, gibt uns die Berechtigung, die schwere, neu-synthetisierte RNS des Homogenats als Kern-RNS zu bezeichnen.

4. Die schnell markierte RNS ist instabil.

Um Einblick in das Schicksal der neu-synthetisierten RNS zu bekommen, wurde ihr Sedimentationsverhalten nach Gabe von Aktinomycin D bzw. nicht markierter Orotsäure untersucht. Die verwendete Aktinomycin D-Dosis blockiert die RNS-Synthese zu etwa 80-90 % (53, 64).

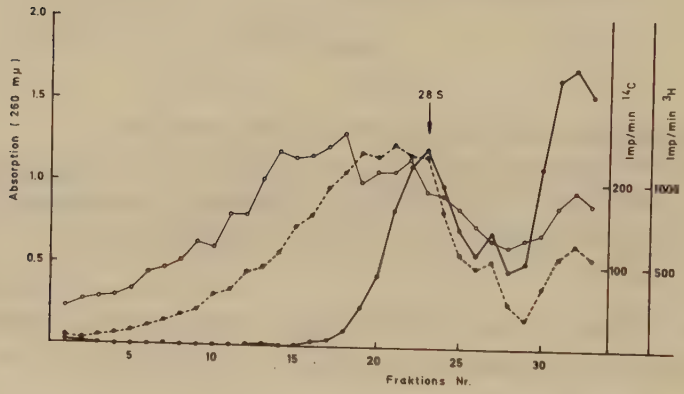


Abb. 10

Sedimentationsprofil der schnell markierten RNS nach Aktinomycin D-Gabe

Aktinomycin D (1,75 mg/kg) wurde zur Zeit 0 Ratten intraperitoneal injiziert, die 4 und 35 Minuten vorher ^{14}C-Orotsäure (30 µC/100 g) bzw. ^{3}H-Orotsäure (100 µC/100 g) erhalten hatten. Die Tiere wurden 15 min nach Gabe des Aktinomycin D getötet. Die RNS wurde im Saccharose-Dichtegradienten 12 Stunden bei 21.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

Sowohl nach Gabe von Aktinomycin D (Abb. 10) als auch nach "chase" mit Orotsäure (Abb. 11; hierbei wird die markierte Orotsäure durch Zugabe nicht markierter so stark verdünnt, daß praktisch keine radioaktive Orotsäure mehr in RNS eingebaut wird) verschiebt sich das Sedimentationsprofil der für 35 bzw. 4 Minuten markierten RNS zu leichteren Sedimentationswerten.

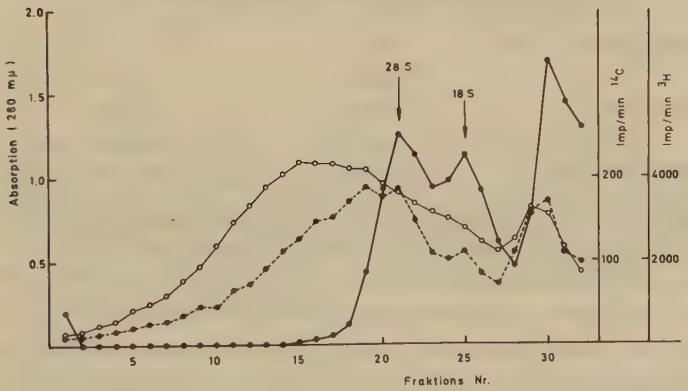


Abb. 11

Sedimentationsprofil der schnell markierten RNS nach Verdünnung der radioaktiven Orotsäure mit kalter Orotsäure

Nach Doppelmarkierung wie in Abb. 9 beschrieben, wurde nicht markierte Orotsäure i.p. in einer Konzentration injiziert, um die radioaktive Orotsäure 1:1000 zu verdünnen. Die Tiere wurden 15 Minuten später getötet.
Zentrifugationsbedingungen wie in Abb. 9.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

Dieser Effekt ist ausgeprägter nach 35 Minuten. Nur nach dieser Markierungszeit ergibt sich eine Hervorhebung des 18 S-Gipfels.
Tabelle 2 verdeutlicht diesen Effekt des Aktinomycin D; der Anteil der RNS >45 S ist als Prozent der Gesamt-RNS 18 S-80 S von Kontroll- und Aktinomycin D-Experimenten ausgedrückt.

Tabelle 2: Vergleich der markierten Leber-RNS von Kontroll- und Aktinomycin D-behandelten Tieren

Markierungszeit (min)	>45 S	45 S - 18 S
4	39 %	61 %
+ 15 min Akt. D	29 %	71 %
35	34 %	66 %
+ 15 min Akt. D	20 %	80 %

Aktinomycin D (1,75 mg/kg) wurde zur Zeit 0 Ratten injiziert, die 4 und 35 Minuten vorher ^{14}C-Orotsäure (30 µC/100 g) bzw. ^{3}H-Orotsäure (100 µC/100 g) erhalten hatten. Die Tiere wurden 15 Minuten nach Gabe des Aktinomycin D getötet. Die Werte geben den %-Gehalt der Radioaktivität von 18-80 S wieder, der in den beiden Teilen des Gradienten gefunden worden ist.

Die Instabilität der hochmolekularen RNS zeigte sich auch, als die RNS aus mit Triton X-100 präparierten Kernen extrahiert wurde. Von diesem Detergens ist bekannt, daß es RNS-abbauende Enzyme aktiviert (51). Abb. 12 zeigt das Sedimentationsdiagramm nach Gabe des radioaktiven Vorläufers für 4 bzw. 40 Minuten. Zu beiden Zeiten findet sich keine RNS schwerer als 28 S, der Großteil sedimentiert im 10 S-

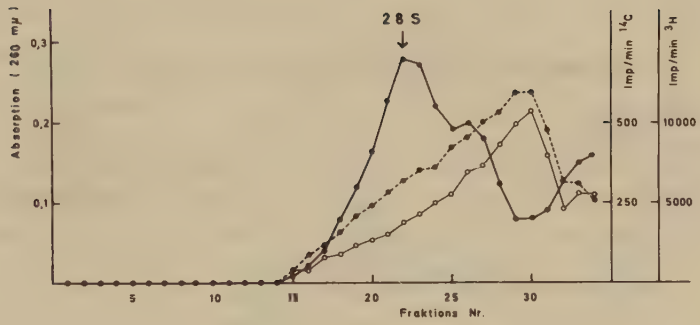


Abb. 12

Sedimentationsprofil der RNS aus "Triton-Kernen"

Nach Doppelmarkierung (40 Minuten: ^{3}H-Orotsäure, 100 µC/100 g, 4 Minuten: ^{14}C-Orotsäure, 100 µC/100 g) wurden Kerne mit dem Detergens Triton X-100 gereinigt und die RNS daraus extrahiert. Dichtegradientenanalyse wie in Abb. 1.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

Bereich. Nach 2,5 Stunden deckt sich die Markierung weitgehend mit dem U.V.-Profil (Abb. 13), die markierte RNS scheint also ribosomale RNS zu sein, während die 4 Min.-RNS im leichten Bereich des Gradienten zurückbleibt. Offensichtlich kann unter diesen Bedingungen die r-RNS, wenn sie einmal ihre endgültige Struktur angenommen hat, nicht mehr durch depolymerisierende Enzyme angegriffen werden. Die 4 Min.-RNS aber ist noch empfindlich gegen die Wirkung von Ribonukleasen.

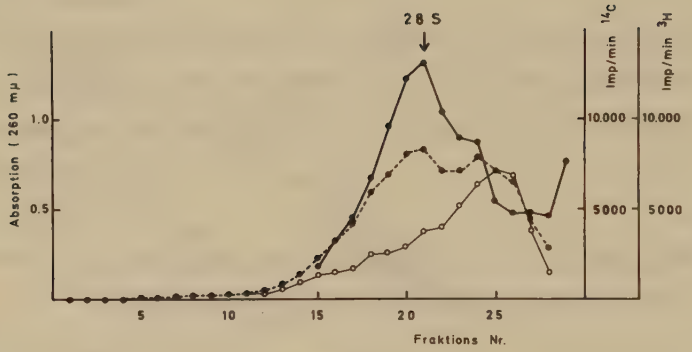


Abb. 13

Sedimentationsprofil der RNS aus "Triton-Kernen"

^{14}C- (30 µC/100 g) und ^{3}H- (100 µC/100 g) Orotsäure wurden 4 Minuten bzw. 2,5 Stunden vor Tötung der Tiere injiziert. Die RNS wurde aus mit Triton X-100 gereinigten Kernen extrahiert. Dichtegradientenanalyse wie in Abb. 1.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

●- - -● ^{3}H-Radioaktivität

5. Die schnell markierte RNS hat eine DNS-ähnliche Basenzusammensetzung.

Um die Natur der schnell markierten RNS weiter zu charakterisieren, wurde ihre Basenzusammensetzung bestimmt. Die RNS wurde mit ^{32}P markiert und die Aktivität der Mononukleotide nach alkalischer Hydrolyse gemessen.

Die Triphosphate, die unmittelbaren RNS-Vorstufen, haben bei der gewählten Markierungszeit gleiche spezifische Aktivität (28). Gleichfalls wird angenommen (32), daß die ein-

zelnen Nukleotide gleichmäßig über die RNS-Kette verteilt sind, eine wichtige Voraussetzung, um mit ^{32}P die Basenzusammensetzung bestimmen zu können.

Tabelle 3: Basenanalyse der schnell markierten RNS

	G	C	A	U	$\frac{A+U}{G+C}$
>55 S	26,0	24,6	23,8	25,6	0,97
45 S	23,8	26,3	22,5	22,9	0,83
28 S	27,5	25,5	24,7	22,3	0,89
18 S	23,4	27,3	27,2	22,1	0,97

2 mC ^{32}P wurde intraperitoneal injiziert, die Ratten 30 Minuten später getötet und die RNS aus dem Homogenat extrahiert. Nach Reinigung der RNS, wie in "Methoden" beschrieben, wurde sie in einem Dichtegradienten aufgetrennt und die Basenzusammensetzung in verschiedenen Teilen des Gradienten bestimmt. Die Werte, ausgedrückt in %, sind Mittelwerte von 4 Bestimmungen, die mit Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese erhalten wurden.

Tabelle 3 gibt die gefundenen Werte in verschiedenen Fraktionen nach Dichtegradientenzentrifugation. Ein relativ niedriger Gehalt an G+C wurde in der Fraktion >45 S gefunden; auch die RNS im ribosomalen Bereich, insbesondere im 18 S-Bereich, ist durch einen relativ niedrigen G+C-Gehalt nach 30 Min.-Markierung gekennzeichnet, während ein höherer Gehalt an G+C im dazwischenliegenden Bereich (35 S - 45 S) gefunden wurde. Die Werte bestätigen die 45 S-Komponente als mit der r-RNS verwandt. Das Verhältnis von G+C / A+U in diesem Bereich ist aber verschieden von

dem reiner r-RNS. Die Unterschiede legen nahe, daß eine RNS mit DNS-ähnlicher Basenzusammensetzung über den ganzen Gradienten verteilt ist, die sich im 45 S-Bereich mit dem G+C-reicheren, ribosomalen Vorläufer mischt.

6. Ein Teil der schnell markierten RNS ist an Ribonukleoprotein-Partikel gebunden.

Abb. 14, Kurve a zeigt das Sedimentationsprofil des Kernüberstandes 35 Minuten nach Injektion von ^{14}C-Orotsäure.

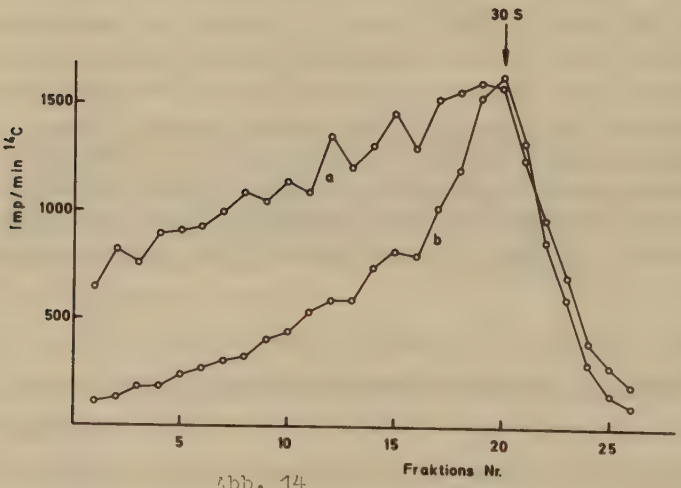


Abb. 14

Sedimentationsdiagramm des Kernüberstandes

30 Minuten nach Gabe von 50 µC ^{14}C-Orotsäure wurden Kerne nach Cheauveaux präpariert, mit Ultraschall im postmikrosomalen Supernatant lysiert und 15 Minuten bei 12.000 Umdrehungen/min zentrifugiert, der Kernüberstand wurde im Dichtegradienten zentrifugiert: 12-30 % Saccharose in Lösung b, 20.000 Umdrehungen/min, 14 Stunden (Kurve a). Kurve b wurde gewonnen durch Lysis der Kerne in Lösung b.

o——o ^{14}C-Radioaktivität

Die Kerne wurden nach Cheauveaux präpariert und im 105.000 g Überstand lysiert. Nach Entfernung des Chromatins durch Zentrifugation diente dieser Kernüberstand zur Sedimentationsanalyse. Etwa 25 % der gesamten Radioaktivität ist im Kernüberstand zu finden. Das radioaktive Material des Kernüberstandes verteilt sich breit über den ganzen Gradienten von 30 S bis 100 S. Wird die Kernlysis im Puffer ausgeführt, findet man weniger Aktivität im schweren Bereich und eine ausgeprägte Gipfelbildung im 30 S-Bereich (Abb. 14, Kurve b). Offensichtlich sind die RNS oder RNS-tragende Strukturen empfindlich für Degradation, die in Gegenwart des im Cytoplasma enthaltenen RNase-Inhibitors verhindert wird.

Die markierte RNS ist an Ribonukleopartikel gebunden, die im folgenden als Kernpartikel bezeichnet sind; sie enthalten RNS und Protein in einem Verhältnis von etwa 1:4.

DNS scheint an dem Aufbau der Partikel nicht beteiligt zu sein. Weder ließ sich DNS mit der Indolbestimmung in den Kernpartikeln nachweisen, noch wurde ihr Sedimentationsprofil durch DNase-Behandlung (20 Minuten, 40 µg/ml 4°C in Lösung b)verändert. DNS ist also kein Strukturteil der Partikel.

Behandelt man die Partikel mit Phenol, so verschiebt sich die Radioaktivität zu niedrigen Sedimentationswerten (s. unten Abschnitt 9). Für die Struktur der Partikel ist also Protein notwendig, das, durch Phenol denaturiert, die gebundene RNS freigibt.

7. Die Kernpartikel sind nicht mit Polyribosomen identisch.

Mit der breiten Sedimentation im Dichtegradienten erinnern die Partikel an Polyribosomen, die entweder im Kern vorhanden sein könnten, oder bei schlechter Präparation der Kerne diese kontaminieren könnten. Um mehr über die Natur der Partikel zu erfahren, haben wir zunächst die spezifische Aktivität der Kernpartikel und der cytoplasmatischen Ribosomen verglichen. Tabelle 4 macht deutlich, daß die Kernpartikel etwa 15fach höhere spezifische Aktivität besitzen.

Tabelle 4: Spezifische Aktivität der cytoplasmatischen Ribosomen und der Kernpartikel

	Ipm/min/mg RNS	
	Ribosomen	Kernpartikel
Exp. 1	30.800	458.000
Exp. 2	16.500	236.000
Exp. 3	37.000	639.000

30 Minuten nach Injektion von 30 µC ^{14}C-Orotsäure wurden Ribosomen und Kernpartikel isoliert und ihre spezifische Aktivität gemessen.

Ribosomen zerfallen durch Mg^{++}-Entzug mit EDTA in die beiden Untereinheiten mit den Sedimentationswerten 30 und 50 S. Durch EDTA-Behandlung konnten wir leicht eine Dissoziation der Ribosomen erreichen (Abb. 15). Die Radioaktivität sedimentiert mit der 30 S-Untereinheit, die die Haftstelle für die m-RNS trägt. Unter den gleichen Bedingungen bleibt das Sedimentationsdiagramm der Kernpartikel unverändert. Ihre

Struktur ist also nicht auf die Gegenwart von Mg^{++} angewiesen. Die Kernpartikel sind also nicht mit Polyribosomen identisch. Diese Interpretation wird auch durch die Tatsache gestützt, daß keine ribosomale RNS aus den Kernpartikeln isoliert werden konnte.

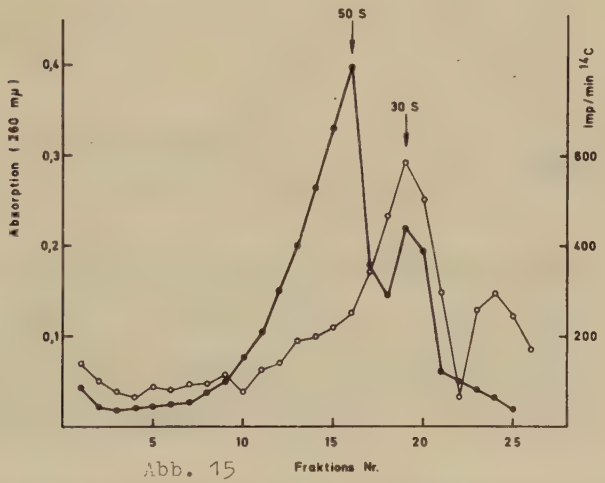


Abb. 15

Sedimentation von Polyribosomen nach Dissoziation mit EDTA

Nach 30 Min.-Markierung mit 30 µC ^{14}C-Orotsäure wurden Ribosomen isoliert und mit 0,02 M EDTA in Lösung d 20 Minuten behandelt. Ultrazentrifugation: 12-30 % Saccharose in Lösung d, 23.000 Umdrehungen/min, 12 Stunden.

●———● U.V. Absorption, o———o ^{14}C-Radioaktivität

8. Die Kernpartikel bestehen aus 30 S-Untereinheiten.

Behandelt man die Kernpartikel vor der Dichtegradientenanalyse mit RNase, so verschwindet das radioaktive Material aus dem schweren Teil des Gradienten und bildet einen

schlanken Gipfel im 30 S-Bereich (Abb. 16). Die Partikel, die man in Gegenwart des cytoplasmatischen Inhibitors isoliert, stellen also Komplexe aus Untereinheiten mit der Größe 30 S dar, die durch RNS zusammengehalten werden.

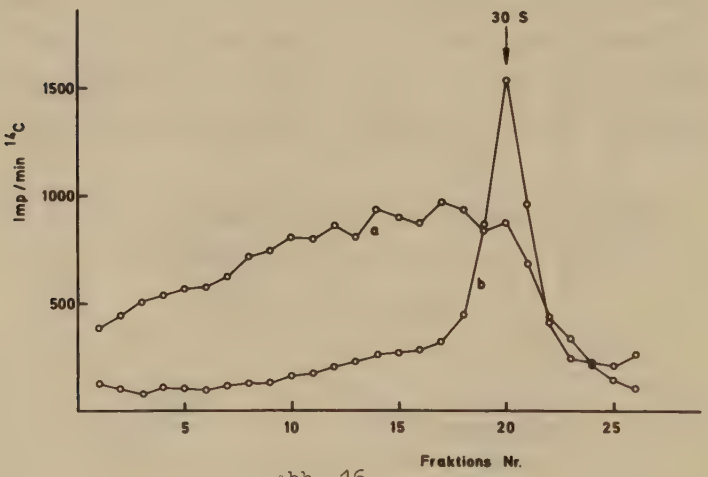


Abb. 16

Sedimentationsprofil der Kernpartikel nach RNase-Behandlung

30 Minuten nach Gabe von 50 µC ^{14}C-Orotsäure wurde der Kern-Überstand wie im Experiment der Abb. 14a gewonnen und ein Teil sofort ultrazentrifugiert (a). Ein Aliquot wurde vor der Dichtegradientenanalyse mit 2γ/ml RNase, 10 Minuten bei +4°C behandelt (b). Zentrifugationsbedingungen: 12-30 % Saccharosegradient in Lösung b, 20.000 Umdrehungen/min, 14 Stunden.

9. Die RNS der Kernpartikel ist "relativ" klein.

Extrahiert man die RNS aus markierten Partikeln mit Phenol und analysiert sie im Dichtegradienten, findet man ein Sedimentationsprofil, das in Abb. 17 wiedergegeben ist.

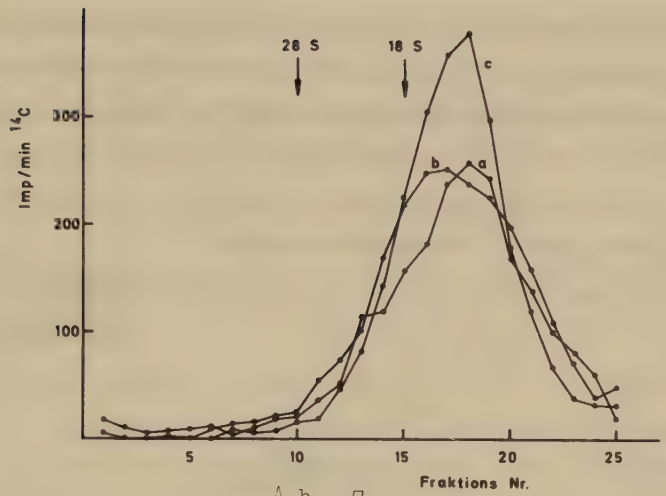


Abb. 7

Sedimentationsprofil der RNS der Kernpartikel aus verschiedenen Teilen des Gradienten

Nach Ultrazentrifugation der Kernpartikel (Gewinnung wie im Experiment der Abb. 14 a) wurde die RNS der Fraktionen a: 2-5, b: 10-12, c: 19-21 mit Phenol extrahiert und im Dichtegradienten analysiert. Zentrifugationsbedingungen: 5-20 % Saccharosegradient in Lösung c, 24.000 Umdrehungen/min, 14 Stunden.

Die drei Kurven repräsentieren die RNS von Partikeln aus verschiedenen Teilen des Gradienten nach Dichtegradientenanalyse von markierten Kernpartikeln. Die RNS sedimentiert relativ homogen im Bereich von 10-20 S. Die RNS aus verschieden großen Partikeln zeigt gleiche Sedimentationswerte. Sie ist im Vergleich mit der aus dem Homogenat gewonnenen RNS klein.

Es gelang aber auch, höher molekulare RNS aus den Partikeln zu isolieren, wenn diese unter der ständigen Schutzwirkung des cytoplasmatischen RNase-Inhibitors gewonnen wurden. In

diesem Fall wurden die Gradienten für die Dichtezentrifugationsanalyse der Kernpartikel nicht aus Puffer b, sondern aus dem postmikrosomalen Überstand in Lösung b hergestellt. Die RNS sedimentiert dann breiter, etwa von 10-40 S (Abb. 18). Die RNS aus verschieden schweren Partikeln besitzt die gleichen Sedimentationsgrößen.

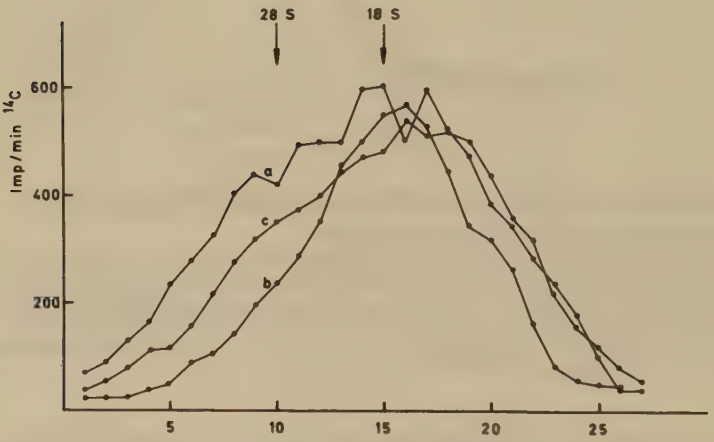


Abb. 18

Sedimentationsprofil der RNS der Kernpartikel aus verschiedenen Teilen des Gradienten

Kernpartikel wurden wie im Experiment der Abb. 17 im Saccharosegradienten: 12-30 %, 14 Stunden bei 20.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Die Gradienten wurden aus postmikrosomalem Überstand hergestellt. Die RNS der Fraktionen a: 2-5, b: 10-12, c: 19-21 wurde mit Phenol extrahiert und im Dichtegradienten: 5-20 % Saccharose in Lösung c, 24.000 Umdrehungen/min, 14 Stunden ultrazentrifugiert.

Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, daß die Partikel eine Nuklease enthalten, die ihre Wirkung bei der Zentrifu-

gation im Puffer entfaltet, bei der Zentrifugation im postmikrosomalen Überstand jedoch - jedenfalls zum Teil - inhibiert wird. Diese Experimente ließen daran denken, daß die Partikel eine Funktion bei dem Ab- und Umbau der RNS übernehmen.

10. Die Kernpartikel sind in der Lage, hochmolekulare RNS abzubauen.

Um dies zu untersuchen, wurde RNS nach 20 Min.-Markierung aus dem Homogenat extrahiert, im Dichtegradienten zentrifugiert und der hochmolekulare Anteil mit nicht markierten Partikeln inkubiert. Ein Aliquot der RNS wurde unter den gleichen Bedingungen ohne Partikel inkubiert und diente als Kontrolle. Abb. 19 zeigt die Sedimentationsanalyse der RNS nach der Inkubation. Etwa 50 % der Radioaktivität ist verschwunden, die RNS ist durch die Inkubation mit Partikeln wesentlich kleiner geworden. Aus den Kurven geht hervor, daß dieses RNS-abbauende Enzym eher durch sukzessive Verkürzung der Polynukleotidkette, als durch Umwandlung eines größeren Moleküls in mehrere kleine wirkt.

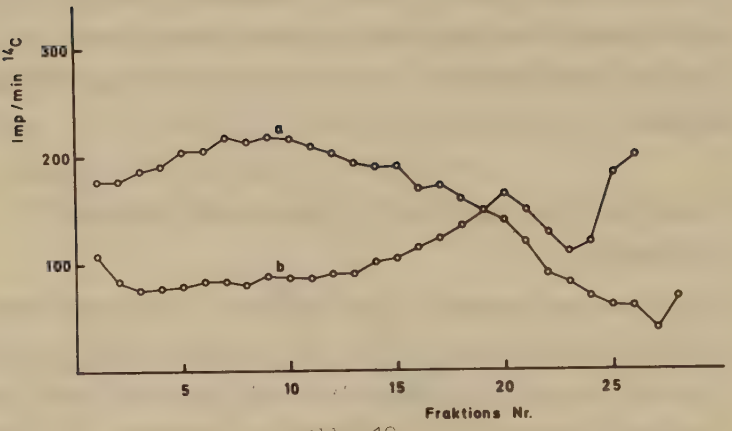


Abb. 19

Wirkung der Kernpartikel auf hochmolekulare RNS

20 Minuten nach Markierung mit 50 µC ^{14}C-Orotsäure wurde die RNS aus dem Homogenat extrahiert und im Saccharosegradienten ultrazentrifugiert. Die RNS >45 S wurde gepõlt, mit Alkohol präzipitiert und ein Teil mit nicht markierten Kernpartikeln in Lösung e 14 Minuten bei 37 °C inkubiert (Kurve b). Ein gleicher Teil, ohne Partikel inkubiert, diente als Kontrolle (Kurve a).
Die Kernpartikel wurden nach Isolierung im Dichtegradienten (Bedingungen wie in Abb. 14) aufgetrennt und die Partikel im Bereich von 30 S - 45 S 1 Stunde bei 65.000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in Lösung e aufgenommen und zur Inkubation verwendet.
Proteinkonzentrationen der Kernpartikel im Ansatz 0.24mg.
Nach der Inkubation wurden gleiche Teile von beiden Ansätzen auf den Dichtegradienten (12-30 % Saccharose in Lösung c) aufgetragen und 14 Stunden bei 20.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

IV. Diskussion:

Die vorliegende Arbeit wurde unternommen, um einige Eigenschaften der neu-synthetisierten RNS der Rattenleber zu untersuchen. Um die RNS in statu nascendi zu erhalten, wurde großer Wert darauf gelegt, RNS-abbauende Prozesse zu verhindern. Als entscheidend hat sich hierzu die RNS-Extraktion direkt aus dem Homogenat erwiesen, denn der Anteil der schnell sedimentierenden RNS ist dabei eindeutig größer als bei der RNS-Extraktion aus Kernen, wie ein Vergleich von Abb. 8 und Abb. 3 beweist. Die Schutzwirkung eines im Cytoplasma enthaltenen RNase-Inhibitors ist in mehreren Arbeiten herausgestellt worden (2, 25, 36). Die Verwendung von Natriumdodecylsulfat, Bentonit und Polyvinylsulfat, die sich als wirksame RNase-Inhibitoren bei der Isolierung von RNS bewährt haben (52, 69), mag zur Bewahrung der ursprünglichen RNS-Größe noch beigetragen haben.

Nach kurzer Markierung (4 Minuten) verteilt sich die schnell markierte RNS heterogen (10 S - 80 S) im Dichtegradienten. Nur ein kleiner Teil sedimentiert in der 45 S-Region, die für den ribosomalen Vorläufer charakteristisch ist. Die polydispers sedimentierende RNS scheint somit von ihm verschieden zu sein.

In dieselbe Richtung weist die Basenzusammensetzung: Außerhalb der 45 S-Region zeigt die RNS einen höheren A + U-Gehalt. Der G + C-Gehalt der 45 S-RNS, der von dem der r-RNS immer noch entfernt ist, erlaubt den Schluß, daß es sich hier um ein Gemisch des ribosomalen Vorläufers mit A + U-reichem

Material handelt. Die Experimente mit Aktinomycin D unterstützen diese Interpretation, daß die heterogen sedimentierende, schnell markierte RNS nicht mit dem ribosomalen Vorläufer identisch ist.

Nach längerer Markierung staut sich die Radioaktivität im 30 S - 50 S-Bereich an. Der Anstau ist auf die Synthese des ribosomalen Vorläufers zurückzuführen, dessen Halbwertzeit auf 8 Minuten geschätzt wurde (43). Dieser Befund ist ein Hinweis auf einen schnelleren turnover der schnell markierten heterogenen RNS im Vergleich zum ribosomalen Vorläufer.

Die neu-synthetisierte RNS scheint also aus zwei Klassen zu bestehen:

1. Dem ribosomalen Vorläufer.
Unsere Ergebnisse bestätigen die Existenz dieser im 45 S-Bereich sedimentierenden RNS als Komponente der schnell markierten RNS.

2. Einer RNS mit sehr breitem Sedimentationsprofil.
Diese scheint die zuerst synthetisierte RNS zu sein; sie verschwindet schnell wieder in Gegenwart von Aktinomycin D oder nach Verdünnung des radioaktiven Vorläufers mit nicht markierter Orotsäure. Ihre Basenzusammensetzung liegt zwischen der der r-RNS und der der homologen DNS.

Über die Ursache der Heterogenität - ob sie Ausprägung unterschiedlicher Teile des Genoms widerspiegelt, ob sie intra- oder extrazellulären Abbau darstellt, ob sie durch teilweise fertiggestellte Moleküle zustande kommt - erlauben unsere Ergebnisse keine Entscheidung. Die Stabilität der hochmolekula-

ren RNS nach DNase-, Pronase- und EDTA-Behandlung macht die Annahme, daß diese großen Moleküle durch Aggregation aus kleineren entstanden sind, unwahrscheinlich. Da die Natur dieses hypothetischen Aggregats unbekannt ist, kann seine Existenz jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Unsere Ergebnisse schließen auch nicht die Möglichkeit von Konformationsänderungen aus, wie sie von Harris unter bestimmten Bedingungen gefunden wurden (3). Scherrer konnte jedoch mit einer elektronenmikroskopischen Aufnahme nachweisen, daß die 70 S-RNS, die er aus Entenerythrozyten isoliert hat, tatsächlich eine kontinuierliche Polynukleotidkette mit einer Länge von 5 - 6 µ, entsprechend 20.000 Nukleotiden, darstellt (58).

Nach Aktinomycin D nimmt der relative Anteil der RNS > 45 S ab; der Effekt ist nach 30 Min.-Markierung ausgeprägter als nach 4 Minuten. Die Interpretation der Experimente nach Blockierung der RNS-Synthese ist schwierig; eine Möglichkeit ist die größere Instabilität der schweren RNS, wie es von Warner et al. für die HeLa-Zelle diskutiert wurde (70).

Die RNS, für 4 bzw. 35 Minuten markiert, verhält sich unterschiedlich nach Gabe von Aktinomycin D. Wird nach Doppelmarkierung der RNS mit ^{14}C-Orotsäure bzw. ^{3}H-Orotsäure für 4 bzw. 35 Minuten Aktinomycin D injiziert, so findet man 15 Minuten später eine Hervorhebung des 18 S-Gipfel in der 35 Minuten-Kurve, nicht aber in der 4 Minuten-Kurve. Offensichtlich fehlt in der RNS nach sehr kurzer Markierungszeit der ribosomale Vorläufer.

Zusammenfassend lassen sich der schnell markierten RNS folgende Eigenschaften zuordnen:

a) Nach kurzer Markierung ist die schnell markierte RNS über den ganzen Gradienten (10 S - 80 S) verteilt. Etwa 30 % sedimentiert schwerer als 45 S.

b) Die schwere RNS scheint einen großen turnover zu haben.

c) Ihre Basenzusammensetzung gleicht der der homologen DNS.

d) Die neu-synthetisierte RNS bleibt fast ausschließlich auf den Zellkern beschränkt. Die RNS des Cytoplasmas ist im 28 S bzw. 18 S-Bereich konzentriert.

Über die biologische Bedeutung dieser schnell markierten RNS erlauben unsere Ergebnisse nur spekulative Überlegungen. Die schnell markierte RNS besitzt einige Eigenschaften, die m-RNS zugeschrieben werden können: Die schnelle Markierung, die Heterogeneität im Dichtegradienten, die metabolische Instabilität und die DNS-ähnliche Basenzusammensetzung. Andere Beobachtungen aber sprechen gegen eine Beziehung dieser Kern-RNS zu der cytoplasmatischen m-RNS.

Quantitativ betrachtet wird anscheinend wesentlich mehr RNS im Kern gebildet als im Cytoplasma an m-RNS benötigt wird. Der Großteil bleibt im Kern und wird offensichtlich dort metabolisiert, wie es auch Harris (20) und McCarthy (61) für die HeLa-Zelle bzw. die Rattenleber mit anderen Methoden gezeigt haben. Ziehen wir außerdem in Betracht, daß die cytoplasmatische m-RNS relativ stabil ist, also eine viel größere Lebensdauer als die Kern-RNS hat (53), so vertieft sich noch diese Diskrepanz zwischen gebildeter Kern-RNS und im Cytoplasma erscheinender RNS.

In qualitativer Hinsicht fällt auf:

1. Zwischen Kern-RNS und cytoplasmatischer RNS besteht ein Größenunterschied.
2. Während die Kern-RNS keine einheitliche Fraktion darstellt, vielmehr eine große Variation im Molekulargewicht zeigt, ist die cytoplasmatische RNS auf den 28 S und 18 S-Bereich konzentriert.

Es bestehen also eindeutige qualitative und quantitative Unterschiede zwischen dem Transskriptionsprodukt, der neu-synthetisierten RNS, und der funktionierenden RNS des Cytoplasmas. Wenn eine Vorläufer-Produkt-Beziehung zwischen diesen beiden besteht, wird die Wirkung spezifischer Enzyme für den Ab- und Umbau der RNS notwendig. Einige Eigenschaften der Kernpartikel lassen daran denken, daß sie eine Funktion in diesem Prozeß übernehmen:

1. Die Kernpartikel sind Strukturen, an die schnell markierte RNS gebunden ist.
2. Die RNS der Partikel ist wesentlich kleiner als die schnell markierte RNS, die aus dem Homogenat mit Phenol extrahiert werden kann.
3. Die Partikel sind in der Lage, in vitro schnell markierte, hochmolekulare RNS anzugreifen und umzubauen.

Nach dieser Vorstellung würde die RNS zunächst in polygener Form synthetisiert und von den Partikeln übernommen. Anschließend kommt durch die Wirkung spezifischer Enzyme die Umwandlung in die biologisch aktiven Moleküle zustande. Aus der gesamten neu-synthetisierten RNS würden nur die Moleküle ausge-

wählt, die als cytoplasmatische m-RNS wirken sollen, der Großteil der RNS würde dann im Zellkern von den Partikeln abgebaut. Diese Interpretation findet eine Stütze in der Tatsache, daß die Enzym-Synthese nicht nur auf dem Transskriptionniveau reguliert wird (33, 66).

Für den Aufbau der Kernpartikel läßt sich folgendes Modell bilden: Die Partikel scheinen Komplexe aus Untereinheiten der Größe 30 S zu bestehen, die durch eine RNS zusammengehalten werden. Die Interpretation stützt sich auf die RNase-Experimente: Es gelingt, die Komplexe in Untereinheiten der Größe 30 S zu zerlegen, die markierte RNS dieser Untereinheiten ist hier zu Oligonukleotiden abgebaut. Die Struktur der Untereinheit ist also nicht an die markierte RNS gebunden. Die unterschiedliche Größe der Partikel käme zustande durch die unterschiedliche Anzahl von Untereinheiten, die von der RNS gebunden werden, da diese in allen Bereichen des Gradienten gleich groß ist.

Einige Befunde über die Struktur der Partikel werden durch kürzlich erschienene Arbeiten russischer Autoren bestätigt (54, 55), die den Partikeln eine Aufgabe beim Transport der RNS vom Kern zum Cytoplasma zusprechen möchten.

Die Bildung der funktionierenden RNS des Cytoplasmas aus der neu-synthetisierten Kern-RNS scheint also in mehreren Schritten zu verlaufen:

1. Transskription der Gene in RNS.
2. Umwandlung polycistronischer Genabschriften in die biologisch aktiven Moleküle.

3. Elimination eines Teils der neu-synthetisierten RNS.

4. Transport zum Cytoplasma.

Da jeder dieser Schritte einer Regulation unterliegen wird, ist hier der Ort zu sehen, wo Hormone steuernd eingreifen können. Die Erkenntnisse, die wir aus den beschriebenen Experimenten über den Ablauf der RNS-Synthese gewonnen haben, werden uns erlauben, die Wirkung von Hormonen auf die aufgeführten Teilprozesse detaillierter zu untersuchen.

V. Zusammenfassung:

Die Ribonukleinsäuren spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese. Sie üben ihre Funktion im Cytoplasma aus, ihre Synthese erfolgt aber im Zellkern. Im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus von Hormonen - einige Hormone entfalten ihre Wirkung durch Genaktivierung - ist die neu-synthetisierte RNS von großem Interesse.

Die schnell markierte RNS, die nach 4 Minuten-Markierung aus dem Leberhomogenat der Ratte extrahiert werden kann, sedimentiert heterogen im Saccharose-Dichtegradienten zwischen 10 S und 80 S. Nach 30 Minuten-Markierung erscheint ein Anstau markierter RNS im 30 S - 50 S-Bereich, der auf die Synthese des ribosomalen Vorläufers zurückzuführen ist. Ein Vergleich dieser Sedimentationsdiagramme nach verschieden langer Markierung weist auf einen schnelleren turnover der heterogen sedimentierenden RNS.

Der größte Teil der neu-synthetisierten RNS bleibt auf den Zellkern beschränkt. Die markierte RNS des Cytoplasmas ist in den beiden ribosomalen Gipfeln konzentriert.

Das Sedimentationsprofil der schnell markierten RNS ist unverändert nach DNase-, Pronase- und EDTA-Behandlung. Eine Aggregatbildung durch Protein, DNA und bivalente Kationen ist daher unwahrscheinlich.

Die schnell markierte, heterogen sedimentierende RNS gleicht in ihrer Basenzusammensetzung mehr der DNS.

Nach Blockierung der RNS-Synthese mit Aktinomycin D und mit nicht markierter Orotsäure in hoher Konzentration verschiebt sich das Sedimentationsprofil der schnell markierten RNS zu niedrigeren Sedimentationswerten.

Eine Markierung des 18 S-ribosomalen RNS-Gipfels nach Gabe von Aktinomycin D wurde nur nach 30 Minuten, nicht aber nach 4 Minuten-Markierung beobachtet. In der für 4 Minuten markierten RNS scheint der ribosomale Vorläufer noch zu fehlen.

Die RNS, die aus mit Triton X-100 präparierten Kernen gewonnen wurde, sedimentiert im oberen Teil des Gradienten. Die neu-synthetisierte RNS ist offensichtlich empfindlich gegenüber RNS-abbauenden Enzymen, die durch dieses Detergens aktiviert werden.

Etwa 25 % der schnell markierten RNS ist an Ribonukleoprotein-partikel gebunden. Die Partikel sind Komplexe aus 30 S Untereinheiten, die durch RNS zusammengehalten sind. Die markierte RNS der Partikel ist relativ klein. Die Partikel sind in der Lage, in vitro RNS abzubauen. Es wird ihnen die Aufgabe zugesprochen, bei dem Um- und Abbau der RNS mitzuwirken.

Nach dieser Vorstellung wird die RNS zunächst in polygener Form synthetisiert und von den Partikeln übernommen. Durch die Wirkung spezifischer Enzyme kommt anschließend die Umwandlung in die biologisch aktiven Moleküle zustande. Aus der gesamten neu-synthetisierten RNS werden nur die Moleküle ausgewählt, die als cytoplasmatische m-RNS wirken sollen; der Großteil der RNS wird im Zellkern abgebaut.

Literatur

1. Attardi, G., Parnas, H., Hwang, M.J.H. and Attardi, B., J. Mol. Biol. 20 (1966) 145.
2. Blobel, G. and Potter, V.R., Proc. Nat. Acad. Sci. 55 (1966) 1283.
3. Bramwell, M.E. and Harris, H., Biochem. J. 103 (1967) 816.
4. Brawerman, G., Gold, L. and Eisenstadt, J., Proc. Nat. Acad. Sci. 50 (1963) 630.
5. Brawerman, G., Biezunski, N. and Eisenstadt, J., J. Biochem. Biophys. Acta 103 (1965) 201.
6. Brown, D.D. and Gurdon, J.B., Proc. Nat. Acad. Sci. 51 (1964) 139.
7. Cheauveaux, J., Moulé, Y. and Rouiller, C., Exp. Cell Res. 11 (1956) 317.
8. Ceriotti, G., J. Biol. Chem. 199 (1957) 297.
9. Clever, U. and Karlson, P., Exp. Cell Res. 20 (1960) 623.
10. Click, R.E., Biochim. Biophys. Acta, 129 (1966) 424.
11. Crick, F.H.C., Progr. Nucl. Acid Research 1 (1963) 163.
12. Davidson, J.N. (1965) The Biochemistry of the Nucleic Acids.
13. DiGirolamo, A., Henshaw, E.C. and Hiatt, H.H., J. Mol. Biol. 8 (1964) 479.
14. Ellem, K.A., J. Mol. Biol. 20 (1966) 283.
15. Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Tsugita, A., Virology 14 (1961) 541.
16. Georgiev, G.P., Samarina, O.P., Lerman, M.B., Smirnov, M.N. and Severtzov, A.N., Nature 200 (1963) 1291.
17. Hadjivassiliou, A. and Brawerman, G., Biochem. Biophys. Acta 103 (1965) 211.
18. Hadjivassiliou, A. and Brawerman, G., Biochemistry 6 (1967) 1934.
19. Harbers, D., Die Nukleinsäuren, (1964) Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.
20. Harris, H., Progress in Nucleic Acid Research 2 (1963) 19.

21. Henshaw, E.C., Revel, M. and Hiatt, H.H., J. Mol. Biol. 14 (1965) 241.
22. Hiatt, H.H., J. Mol. Biol. 5 (1962) 217.
23. Houssais, J.F. and Attardi, G., Proc. Nat. Acad. Sci. 56 (1966) 616.
24. Hurwitz, J., Bresler, A. and Diringer, R., Biochim. Biophys. Res. Comm. 3 (1960) 15.
25. Hymer, W.C. and Kuff, E.L., Biochim. Biophys. Res. Comm. 15 (1964) 506.
26. Ingram, V.M., (1965) The Biosynthesis of Macromolecules, New York/Benjamin.
27. Imamoto, F., Morikawa, N. and Sato, K., J. Mol. Biol. 13 (1965) 169.
28. Itzhaki, S. and Whittle, E.D., Biochim. Biophys. Acta 87 (1964) 554.
29. Jacob, F. and Monod, J. J. Mol. Biol. 3 (1961) 318.
30. Karlson, P., Dtsch. Med. Wschr. 86 (1961) 668.
31. Kidson, C., Kirby, K.S. and Ralph, R.K., J. Mol. Biol. 6 (1963) 312.
32. Kitzazume, Y. and Yćas, M., Biochim. Biophys. Res. Comm. 76 (1963) 391.
33. Knox, W.E. and Greengard, O., The Advance in Enzyme Regulation 3 (1965) 247.
34. Lane, B.G., Biochim. Biophys. Acta 72 (1963) 110.
35. Latham, H. and Darnell, J.E., J. Mol. Biol. 14 (1965) 1.
36. Lawford, G.R., Sadowski, P. and Schachter, H., J. Mol. Biol. 23 (1967) 81.
37. Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.
38. Martin, R.G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 (1963) 357.
39. Matus, A.J., Ralph, R.K. and Mandel, H.G., J. Mol. Biol. 10 (1964) 295.
40. McConkey, H.E. and Hopkins, J.W., Proc. Nat. Acad. Sci. 51 (1964) 1197.

41. Monier, R., Naono, S., Hayes, D., Hayes F. and Gros, F., J. Mol. Biol. 5 (1962) 311.
42. Munro, A.J. and Korner, A., Biochem. J. 92 (1964) 37p.
43. Muramatsu, M., Hodnett, J.L., Steele, W.J. and Busch, J., Biochim. Biophys. Acta 123 (1966) 116.
44. Muramatsu, M., Hodnett, J.L. and Busch, H., J. Biol. Chem. 241 (1966) 1544.
45. Ogur, M. and Rosen, G., Arch. Biochem. Biophys. 25 (1949) 265.
46. Okamura, N. and Busch, H., Cancer Res. 25 (1965) 693.
47. Pelling, G., Nature 184 (1959) 655.
48. Perry, R.P., Proc. Nat. Acad. Sci. 48 (1962) 2179.
49. Petrović, J. and Petrović, S., Anal. Biochem. 15 (1966) 187.
50. Prescott, D.M., Progr. Nucl. Acid Research 3 (1964) 33.
51. Rahman, Y.E., Biochim. Biophys. Acta 119 (1966) 470.
52. Rake, A.V. and Graham, A.F., Biophys. J. 4 (1964) 267.
53. Revel, M. and Hiatt, H.H., Proc. Nat. Acad. Sci. 51 (1964) 810.
54. Samarina, O.P., Lukanidin, E.M., Georgiev, G.P., Biochim. Biophys. Acta 142 (1967) 561.
55. Samarina, O.P., Abstracts of Communications of the 4th FEBS Meeting, Universitetsforlaget, Oslo.
56. Scherrer, K. and Darnell, J.E., Biochem. Biophys. Res. Comm. 7 (1962) 486.
57. Scherrer, J., Latham, H. and Darnell, J.E., Proc. Nat. Acad. Sci. 49 (1963) 240.
58. Scherrer, K., Marcaud, L., Zajdela, F., London, J.M. and Gros, F., Proc. Nat. Acad. Sci. 56 (1966) 1571.
59. Seed, R.W. and Goldberg, J.W., Proc. Nat. Acad. Sci. 50 (1963) 275.
60. Sekeris, C.E. and Lang, N., Life Sci. 3 (1964) 169.
61. Shearer, R.W. and McCarthy, B.J., Biochemistry 6 (1967) 283.

62. Soeiro, R., Birnboim, H.C. and Darnell, J.E., J. Mol. Biol. 19 (1966) 362.
63. Staehlin, T., Wettstein, F.O., Oura, H. and Noll, H., Nature 201 (1964) 264.
64. Steele, W.J. and Busch, H. Biochim. Biophys. Acta 129 (1966) 54.
65. Tomaoki, T. and Mueller, G.C., Biochem. Biophys. Res. Comm. 9 (1962) 451.
66. Tomkins, G.M. und Thompson, E.B., 18. Mosbacher Kolloquium, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
67. Trakatellis, A.C., Axelrod, A.E. and Montjor, M., J. Biol. Chem. 239 (1964) 4237.
68. Tsanev, S., Abstracts of Communications of the 4th FEBS Meeting, Universitetsforlaget, Oslo, 1967.
69. Uchiyama, T., Fausto, N. and Van Lancker, J.N., J. Biol. Chem. 241 (1966) 991.
70. Warner, J.R., Soeiro, R., Birnboim, H.D., Girard, M. and Darnell, J.E., J. Mol. Biol. 19 (1966) 349.
71. Watson, J.D., Science 17 (1963) 140.
72. Watson, J.D., (1965) Molecular Biology of the Gene, New York/Benjamin.
73. Weiss, S.B., Proc. Nat. Acad. Sci. 46 (1960) 1020.
74. Yoshikawa-Fukada, M., Fukada, T. and Kawade, Y., Biochim. Biophys. Acta 103 (1965) 383.
75. Yoshikawa-Fukada, M., Biochim. Biophys. Acta 123 (1966) 91.

Für die Überlassung des Themas, der Anleitung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeit bin ich Herrn Dozent Dr. C.E. Sekeris sehr dankbar. Herrn Dr. D. Gallwitz, Herrn Dr. Seifart, Herrn Dr. J. Lukács und Herrn Dr. J. Homoki danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen.
Frau von Hansen, Fräulein Hellmann und Fräulein Haenisch danke ich für die technische Mithilfe.
Herrn Professor Dr. P. Karlson bin ich für die Möglichkeit zur Ausführung und für das Interesse am Fortgang der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1.5.1940 wurde ich, Günther Schütz, als zweiter Sohn des Geschäftsführers Willi Schütz und seiner Ehefrau Mathilde geb. Schneider in Bad-Schwalbach geboren.

Am 22.2.1960 bestand ich die Reifeprüfung am Gutenberg-Gymnasium in Wiesbaden. Mit dem Sommersemester 1960 begann ich das Medizinstudium in Frankfurt und legte nach fünf Semestern die ärztliche Vorprüfung ab. In den klinischen Semestern studierte ich in Bern und in Gießen, wo ich am 7.3. die ärztliche Prüfung bestand. Ich famulierte in Wiesbaden, Greenock (Schottland) und Trenton (U.S.A.). Im April 1966 begann ich mit der vorliegenden Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Frankfurt: Artelt, Czerny, Frick, Griersberg, Habsguth, Heinz, Müser, Ortmann, Royen, Starck, Wezler, Wieland;

in Bern: Escher, Hadorn, Hallauer, Lenggenhager, Rossi, Wildbolz, Wildbrandt;

in Gießen: Barth, Bohnstedt, Derwort, Dost, Eigler, Erbslöh, Grab, Heiss, Keil, Kemkes, Kepp, Oksche, Ott, Pia, Rauh, Rettig, Richter, Sandritter, Staudinger, Stiller, von Uexküll, Voegt, Vosschulte, Wassner, Wellner, Winter.